

◎日本国特許庁(JP)  
◎公表特許公報(A)

◎特許出願公表  
平5-500516

◎公表 平成5年(1993)2月4日

◎Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求	予備審査請求	有	部門(区分)	3(2)
A 61 K 35/14	ADT	9165-4C						
37/02	ADA	8314-4C						
1/56		6807-4B						
◎C 12 Q								

(全15頁)

◎発明の名称 効能ある組織治療のための選択された量の血小板から放出された物

◎特 願 平2-514044  
◎出 願 平2(1990)9月14日

◎翻訳文提出日 平4(1992)3月16日  
◎国際出願 PCT/US90/05301  
◎国際公開番号 WO91/04035  
◎国際公開日 平3(1991)4月4日

優先権主張 ◎1989年9月15日◎米国(US)◎408,058

◎発 明 者	ゴードニア, リチャード・エ	アメリカ合衆国ニューヨーク州11720, センターイーチ, エミリー・ドライブ 74
◎発 明 者	グフ, ロナルド・ジー	アメリカ合衆国ニューヨーク州11940, イースト・モリチエス, インレフト・ヴェー・パス 67
◎発 明 者	ニューマン, ダウン・デー	アメリカ合衆国ニューヨーク州11940, イースト・モリチエス, インレフト・ヴェー・パス 67
◎出 願 人	キュラティブ・テクノロジー・ズ・インコーポレーテッド	アメリカ合衆国ニューヨーク州11733, セトウケツト, リサーチ・ウエイ 14
◎代 理 人	弁理士 湯浅 恭三	外5名
◎指 定 国	AU, CA, FI, JP, KR, NO, SU	

請求の範囲

1. 血小板から放出された物をサンプル中に存在する成分の量を検出するアッセイを血小板から放出された物のサンプルについて実施し;そして  
選択された量の血小板から放出された物を含む血小板放出物製品を製造し、該製品は血小板から放出された物のサンプル中の成分の量と、血小板放出物製品中に含まれるべき同一成分のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される。  
こととなる血小板放出物製品の製造方法。
2. 選択された量の血小板から放出された物を含む血小板放出物製品を局所的に適用することとなり、該製品は血小板から放出された物のサンプル中の成分の量と、血小板放出物製品中に含まれるべき同一成分のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される。  
こととなる組織の治療方法。
3. 血小板放出物製品及び血小板から放出された物のサンプルに含まれる血小板から放出された物が、血小板の同じドローから得られる。請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。
4. 血小板放出物製品及び血小板から放出された物のサンプルに含まれる血小板放出物が、同じ動物又はヒトに由来する血小板の異なるドローから得られる。請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。
5. 血小板放出物製品及び血小板から放出された物のサンプル中に含まれる血小板放出物が、動物又はヒトドロー群に由来する血小板からの血小板プールから得られる。請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。
6. 血小板から放出された物のサンプル中に存在する成分が、ベータートロンボグロブリン(beta-thromboglobulin)、血小板由来増殖因子(platelet derived growth factor)、血小板由来血管形成誘導因子(platelet derived angiogenesis factor)、血小板因子4(platelet factor

- 4)、塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor)、酸性繊維芽細胞増殖因子(acidic fibroblast growth factor)、トランスフェリン酸或長因子アルファ(transforming growth factor alpha)、トランスフェリン酸短因子ヘータ(transforming growth factor beta)、血小板由来上皮増殖因子(platelet derived epidermal growth factor)及びフィブロネクチン(fibronectin)からなる群から選択される。  
請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。
7. 血小板から放出された物のサンプル中に含まれる成分がベータートロンボグロブリンである。請求の範囲第6項記載の方法。
8. 血小板放出物製品が、血小板放出物製品1ミリリットル中に約2.5ナノグラムよりも高い濃度でベータートロンボグロブリンを含む。請求の範囲第7項記載の方法。
9. 血小板から放出された物のサンプル中に含まれる成分が血小板由来増殖因子である。請求の範囲第6項記載の方法。
10. 血小板放出物製品が、血小板放出物製品1ミリリットル中に約0.2ナノグラムよりも高い濃度で血小板由来増殖因子を含む。請求の範囲第9項記載の方法。
11. 血小板から放出された物のサンプル中に含まれる成分が血小板因子4である。請求の範囲第6項記載の方法。
12. 血小板放出物製品が、血小板放出物製品1ミリリットル中に約1.0ナノグラムよりも高い濃度で血小板因子4を含む。請求の範囲第11項記載の方法。
13. 血小板から放出された物のサンプル中に含まれる成分が、血小板由来血管形成誘導因子である。請求の範囲第6項記載の方法。
14. 選択された量の血小板から放出された物が、組織治療の有用な効能性をもたすのに十分である。請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。
15. 効能性が少なくとも組織性評価スコアのグレード2と同等である。請求の

範囲第14項記載の方法。

16、組織が哺乳動物組織である、請求の範囲第2項記載の方法。

17、組織がヒト組織である、請求の範囲第16項記載の方法。

18、血小版が哺乳動物血小版である、請求の範囲第3項記載の方法。

19、血小版がヒト血小版である、請求の範囲第18項記載の方法。

20、動物が哺乳動物である、請求の範囲第4項記載の方法。

21、動物が哺乳動物である、請求の範囲第5項記載の方法。

22、血小版から放出された物のサンプルの活性量を反映するアッセイを血小版放出された物のサンプルについて実施し、そして

選択された量の血小版放出物を含む血小版放出物製品を製造し、該量は血小版から放出された物のサンプルの活性量と、血小版放出物製品の同一活性のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、こととなる血小版放出物製品の製造方法。

23、選択された量の血小版からの放出物を含む血小版放出物製品を局所的に適用することからなり、該量は血小版から放出された物のサンプルの活性量と、血小版放出物製品の同一活性のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、こととなる組織の治療方法。

24、血小版放出物製品及び血小版から放出された物のサンプル中に含まれる血小版放出物、血小版の同じドローから得られる、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

25、血小版放出物製品及び血小版から放出された物のサンプル中に含まれる血小版放出物、同じ動物又はヒトに由来する血小版の異なるドローから得られる、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

26、血小版放出物製品及び血小版から放出された物のサンプル中に含まれる血小版放出物、動物又はヒトドナー群に由来する血小版ドローからの血小版ドローから得られる、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

27、血小版から放出された物のサンプルの活性が、繊維芽細胞分裂促進活性

(fibroblast mitogenic activity)、内皮細胞走化活性(endothelial cell chemotaxis activity)、ウサギ角膜アッセイ活性(rabbit corneal assay activity)及び角化細胞走化活性(keratinocyte cell chemotaxis activity)からなる群から選択される、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

28、血小版から放出された物のサンプルの活性が繊維芽細胞分裂促進活性である、請求の範囲第27項記載の方法。

29、血小版放出物製品が、血小版放出物製品1ミリリットル中に約2.5  $\times 10^5$  ED-50ユニットよりも高い繊維芽細胞分裂促進活性を有する、請求の範囲第28項記載の方法。

30、組織が哺乳動物組織である、請求の範囲第23項記載の方法。

31、組織がヒト組織である、請求の範囲第30項記載の方法。

32、血小版が哺乳動物血小版である、請求の範囲第24項記載の方法。

33、血小版がヒト血小版である、請求の範囲第32項記載の方法。

34、動物が哺乳動物である、請求の範囲第25項記載の方法。

35、動物が哺乳動物である、請求の範囲第26項記載の方法。

36、選択された量の血小版から放出された物が、組織治療の実際の効能性をもたらしに十分である、請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。

37、効能性が少なくとも繊維芽細胞スコアのグレード2と同等である、請求の範囲第36項記載の方法。

38、(1)血小版放出サンプル中の成分の量と、血小版放出物製品中に含まれるべき同一成分のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、選択された量の血小版から放出された物；及び

(2)該血小版放出物のための医薬的に受容し得る媒体又は希釈剤

からなる血小版放出物製品。

39、組成物が、血液又は血液成分、及び血小版に含まれるが、血小版によって放出されない血小版ドローと他の物質を真実的に含まない、請求の範囲第3

8項記載の方法。

40、(1)血小版から放出された物のサンプルの活性量と、血小版放出物製品の同一活性のあらかじめ定められた範囲の量とを比較することによって選択される、選択された量の血小版放出物；及び

(2)該血小版放出物のための医薬的に受容し得る媒体又は希釈剤

からなる血小版放出物製品。

41、組成物が、血液又は血液成分、及び血小版に含まれるが、血小版によって放出されない血小版ドローと他の物質を真実的に含まない、請求の範囲第40項記載の方法。

図4 図5 図6

効能ある組織治療のための選択された量の血小版から放出された物

【技術分野】

本発明は、効能ある組織治療のための血小版から放出される物の選択に関する。

【背景技術】

繊維様又は「創傷治癒」は、停止した組織結合及び散在細胞を迅速に分裂し、迅速に動く細胞へと変える、多くの細胞的並びに生化学的変化を含む。この変化は、走化性(細胞の運動)、有糸分裂(細胞分裂)、及びタンパク質合成の増加を含む。表皮細胞、繊維芽細胞、及び毛管内皮細胞が新組織の形成に関与する。表皮細胞は組織修復の部位に移動して分裂し、新しい皮膚(上皮)を形成し；繊維芽細胞は移動して分裂し、細胞間質(内マトリックス)を産生すマトリックスを生産し；毛管内皮細胞は移動して分裂し、繊維芽/コラーゲンマトリックスを産生再生する新しい血管を生産する。

細胞の移動及び分裂は、いくつかの生化学的作因に制御されている。これらの部分的に作用する作因が、各細胞に作用してその移動及び分裂を指示する。

これらの各生化学的作因は、(1)走化性(即ち、化学誘引)で、ある種の細胞の移動(走化性)を引き起こす；(2)分裂促進的(即ち、マイジェン)で、ある種の細胞の分裂(有糸分裂)を引き起こす；及び/又は(3)血管形成促進的(即ち、血管形成誘発因子)で、新しい血管の形成(毛管内皮細胞の移動及び分裂)を引き起こす。生化学的作因の走化性、分裂促進的又は血管形成促進的性質は、一般に走化性、分裂促進性及び血管形成促進性を試験する各種の知アッセイによって決定される。これらのアッセイのいくつかについては以下に記載する。同じ特徴を有するものとするが、各性質の存在をより明確に定義又は測定することである、他のアッセイ座の開発は将来期待される。

血小版由来増殖因子(Platelet-Derived Growth Factor: PDGF)は、繊維芽細胞、平滑筋細胞及びグリラ細胞に対する有

糸分裂及び化学誘引活性を有する、よく性質を知られた30,000ダルトンの二量体糖タンパク質である。PDGFの存在下、繊維芽細胞は遊走を必要とする組織の領域に移動し、創部部位自体において分裂するように刺激される。低濃度のPDGF(約0.5-1ng/ml)にさらされた細胞は移動するように刺激され、高濃度のPDGFを有する環境に移動したときに、分裂するように刺激される。

新表皮形成又は毛管形成促進（新毛管形成）の過程は、毛管形成促進因子によって制御される。由小板から回収される毛管形成促進因子（PDAF）は、毛管上皮細胞に対する分裂増殖活性を有し、純化生化学的製剤を用いて、毛管形成促進因子の方向-ラゲントメントに結合することによって毛管上皮細胞を刺激する。毛管細胞がいったん親毛管から移動し始めると、分裂を始める。多分この分裂は、かつて高活性繊維芽細胞形成因子（FGF）株の中に見いだされた、自己細胞によって生成される、表皮分化促進因子によって制御される。

縦横幹細胞の移動及び有糸分裂と、上皮細胞の移動及び有糸分裂との組み合わせが肉芽組織を生成する。肉芽組織はまた、体液性免疫からのCSA及び血小板からのトランスフェーミング成長因子ベータ(TGF- $\beta$ )の存在によって修復部位に運ばれてくる好中球及び単球中にも豊富にある。これら免疫細胞の存在が感染を減少し、感染を防ぐ。

TGF- $\beta$ は、フィブリン-コラーゲンの合成に機能を有する25,000ダルトン(112アミノ酸)のポリペプチドである。TGF- $\beta$ は組織芽細胞の分裂を阻害し、そのマトリックス生産を増加する。TGF- $\beta$ が分泌を刺激するの、阻害するのとは、組織中に作用する全成分子の機能による。PDGFの存在下では、TGF- $\beta$ は通常分裂を刺激し、一方上皮癌因子(後述)の存在下

肉芽組織の形成後、表皮細胞は切断皮膚端 (cut skin edge) から肉芽組織に移動し、新しい皮膚層を形成し、次いでこれが正常な皮膚に成熟する。この細胞活性は、表皮細胞に対する化学誘引剤である血小板由来上皮増殖因子 (BDFGF) によって少なくとも部分的に制御されている。

感は何か報告されていない。

ニ重脊髄炎において、Knighton et al. Tissue Repair Symposium at Targos Springs, Florida, May 1987 (参照することによりここに寄与される)は、クラーク第3期のPDWHで発生した神経損傷をラサセと比較した。24名の患者が標準的処方に従って創傷治療を受けた。PDWHグループの13名の患者は、21例の創傷のうち、17例において治療8週間後に100%上肢の回復を得た。一方、ラサセグループの11名の患者は、13例の創傷のうち、2例のみが100%上肢に達した。ラサセ非神経創傷を以てPDWHで治療したところ、平均7.1週間で治癒した。PDWH非神経創傷にPDWHを適用したところ、さらに治療5.8週間より100%上肢を達した。

University of Minnesota Wound Care Clinicにおける糖尿病患者の術前治療が切開、糖尿病性足壊疽 (diabetic foot ulcer) 及び下肢外傷手術における3人の全体的な患者群に与えた影響。73名の患者の13例の患者に全6回の食費減 (平均約40% (thickness) から増加を導くために) で分かれた。PDWH治療を全患者に与えた。75%以上が食費減3年後には足の切開を有していた。約70%の患者が再び又は別の手術の切開が必要とされていない。切開の再発率と手術後に26%の患者は、いずれも切開を要しなかった。かなりの切開の再発率とされていない33例の患者の95%以上は切除された。切開に手術の必要性と与えられた症例(n=9)の食費減は86%であった。毎日手術にPDWHを使用することにより、肉芽組織の増殖と上皮形成成長を促進した。慢性性皮膚病治療は、十分に経済的に治療された。

創傷治癒に際する以前の研究において、PDWHF製剤は最終容量1 ml当たり10<sup>8</sup>個の血小板を標準に放出した。ドナーによる変動、又は特定のドナーのための時間による変動やこのような血小板から放出する物質に含まれる創傷治癒因子の能力を縮減するために、血小板放出物の量を調節する試みは何らなされてこなかった。放出物に含まれる治癒因子の能力の変動を考慮しながら、組織の効率的な治癒のための血小板放出物の量を選択する必要があると見做すの目的である。

要約すると、組織修復又は「創傷治癒」の過程は、少なくとも4つの成長因子 TGF- $\beta$ 、PDGF、PDGF及びPDGEFによって制御されている。修復されるべき組織中におけるこれらの成長因子の存在は、繊維芽細胞の移動及び有糸分裂、上皮細胞の移動及びそれに続く有糸分裂、及び表面細胞の移動及び有糸分裂をもたらし、その結果、創傷部位が肉芽組織で満たされ、次いで再上皮化及び皮膚成熟化が起こる。

種間の自然選択のためにこれらの因子の2つの主要なクラスは小児とマクロファージの体内で迅速に破壊される。最近獲得の活性化によって生産されるトロンボンの存在によって、血管壁で放出される。これらの小児血球は以下にPDGF、PDAF、PDEGF、TGF- $\beta$ 及び小児血小板 $\alpha$ 因子（P $\alpha$ )は好中球及び単球に対する化学誘引因子を放出し、種々C5Aの放出に誘引する。PDGF、PDAF、PDEGF及びP $\alpha$ は、それぞれ上記したように前駆体は血液循環中の二重結合が、一重結合PGF- $\beta$ 及びC5Aは単球細胞にマクロファージを誘引する。マクロファージもまた、これらの組織破壊因子に働きかけること、同時に同様のマイトゲン、化学誘引、及び血管形成促進因子を放出する。しかしながら、今後マクロファージにPDEGF-前駆体を濃縮することと期待されている。

非炎症性創傷を改善することができない共通の理由は、感染、乏しい細胞免疫性、少ない繊維芽細胞、新しい毛管の不在及び乏しい炎症性細胞である。一方、炎症性創傷は、単核及びマクロファージ細胞浸潤物、分裂性繊維芽細胞及び多数の血管を特徴とする。

Naughton et al., Ann. Sur. 1986, 204:322-330 (参照することによりここに包含される)は、慢性的血小板性皮膚病瘍を有する患者49名を、造血因子工程軟膏中の自知性血小板由来創傷癒着剤(Platelet Derived Wound Healing Formula: PDWHF)を用いて治療した。個例の治療と共に、創傷を平均19.8週癒治した。100%上皮化の平均期間は10.6週であり、100%血小板は、最初の創傷サイズとPDWHFの創傷の面積との間に線形関係を示していた。黒人、黒人種、ケイワードは最大

〔発明の開示〕

本発明によれば、選択された量の血小板放出物を含む血小板放出物製品を局所的に適用することにより組織が治療される。好ましくは血小板放出物製品は、所望の場合には、繊維芽細胞、毛管上皮細胞及び／又は表面細胞の移動及び／又は分裂を引き起こし、この細胞の分裂又は移動が治療領域における肉芽組織、毛管及び／又は上皮の形成に寄与するのに十分な量で、治療すべき組織に適用される。

本発明は、組成成分を用いて得る山椒小振取物質の製造法を提供する。山椒小振取物質サンプル中に存在する成分の量を示すアッセイを、山椒小振取物質に適用する。成分は、好ましくは射流造粒剤であり、その量は山椒小振取物質中に存在する芳香族の成分の量と調和する。アッセイはこのように成分の量は存在する量と存在するタイム/アッセイであり、又はHPLCの使用による成分の量は存在する量と決定する他のいかなる方法でもあり、アッセイの結果に基づいて、選択された量の山椒小振取物質を含む山椒小振取物質の製造される。山椒小振取物質サンプル中の成分の量と、致動物質中に含まれる同一成分のあらかじめ定められた量の間とを比較することによる結果を提供する。本発明は特に新規に製造された物質を輸送手段に運送することによる経路の追跡法を説明する。

血小板放出物製品を製造する他の方法、及びかかる製品の組織への局所適用は、血小板放出物サンプルの活性量を示すアッセイを血小板放出物サンプルに実施することを要す。

血小板放出物製品及び血小板放出物サンプル中に含まれる血小板放出物は、同じ血管のドロー（draw）から得ることが好ましい。若しくは、血小板放出物製品及び血小板放出物サンプル中に含まれる血小板放出物は、同じ動物又はヒト由来の血管の異なるドローから得ることもできる。更にまたは、血小板放出物製品及び血小板放出物サンプルに含まれる血小板放出物は、単一の動物又はヒト由来の、或いは複数の動物又はヒト由来の、単一又は複数のドローから得た血小板のプールから得ることもできる。

血小板抽出物製品中に含むべき成分の量の範囲は、該血小板製品中に含まれる

血小版放出物の選択された量が、選択された治療パーセントで組織治療の実際の効果を引き起こすのに十分なように、あらかじめ定められる。例えば、治療した組織の50%以上において、少なくともグレード2の慢性性経皮スコア(後ほど定義する)を得るためのこのような治療効果が選択される。若しくは、血小版放出製品の活性量の範囲は、同様に組織治療の所望する効果に基づく。

このような効果のために量があらかじめ定められる成分とは、ベータートロンゴダブリン("B-TG")、PDGF、PDAF、PE-4、電活性FGF、線性FGF、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、PDGF及びフィブロネクチンである。活性とは、組織芽細胞有糸分裂活性("FMA")、上皮細胞分化活性("ECCA")、ウサギ角膜アッセイ活性("RCAA")又は角化細胞分化活性("KCCA")であろう。

最後に、血小版放出物は、かかる血小版放出物のための医薬的に許容し得る担体又は増剤と組み合わせて血小版放出製品を製造することができる。更に、製品は実質的に血液又は血液内染物を含まず、また血小版中には含まれているが、血小版によって放出されない血小版ブーストや他の物質を含んでいない。"治療"は、創傷治療、美容、又は治療すべき組織の領域における血管形成性、有糸分裂性、又は分化活性を促進することが望ましい他の全ての過程を含む。組織への治療の適用は、表1に記載するものを含むが、これに限定されない。このような治療は、組織物を損傷表面又は組織体に適用するという意味において局所的であるが、系統的に適用されない。

#### D、慢性閉塞の予防による皮膚移植における美容的効果の改善

##### IV、無傷の皮膚の再保護

###### A、糖尿病性潰瘍の予防

###### B、放射線性皮膚炎

###### C、フェンフィグスブルガリス(phemphigus vulgaris)

##### V、美容的適用

###### A、毛髪成長

###### B、皮膚再生治療

###### C、皺治療

##### VI、急性外科創傷の治療

A、組織的放出物の生物分解性投与率と組み合わせると、産生期を短くすることによって組織物は通常の創傷修復率を増強することができる。この連動システムは組織物を局所的に任意の外科的創傷、または皮膚の裂目、または体内器官に適用できる。

##### VI、内臓外科的適用

A、組織物は内臓外科的又は外科的創傷の修復を進めることができ、これは肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、及び胆、結腸又は胆嚢摘出後(cholelithiasis)のような物を含むが、これに限定されない。

B、肝臓及び脾臓の外傷的創傷のような内臓創傷への局所的投与

C、組織物は胆管内結核に適用して修復を進めることができる。例えば、胆管内結核を経路的にドレンして、ドレンをその場に保持するときは、その可能性のある部位の修復を進めるために、胆管表面に組織物を局所的に適用されるように、ドレンを通して組織物を注入することができる。

##### VI、軟部組織

###### A、外科的修復

###### B、ウツなどの慢性、非炎症性創傷の修復促進

###### C、ウツ後遺症の修復促進

D、乳癌に侵襲性を経て、乳房が閉鎖することを防ぐために、乳房の創傷治

#### I、慢性の非炎症性皮膚創傷の治療

##### A、慢性性創傷

###### 1、糖尿病性創傷

###### 2、アトピー性アレルギーによる慢性性創傷

###### 3、糖尿病性潰瘍による創傷

##### B、静脈性創傷

###### 1、静脈性潰瘍

###### 2、外傷後静脈性潰瘍

##### C、褥瘡

###### 1、坐骨神経痛

###### 2、皮膚潰瘍

###### 3、腫瘍及び褥瘡

###### 4、他の圧力部分の褥瘡

##### D、持続性皮膚外傷による創傷

##### E、急性創傷の局所的治療

##### A、分離性厚み(split thickness)創傷

###### 1、皮膚移植ドナー部位

###### 2、自動車事故などに由来する創傷

##### B、全厚皮膚喪失

###### 1、創傷性(degloving)損傷

###### 2、外傷性皮膚喪失

###### 3、外傷性皮膚喪失

##### II、火傷

##### A、分離性厚み皮膚移植ドナー部位修復

##### B、内臓組織形成の促進及び初期組織除去及び皮膚移植

##### C、第2度の火傷の再上皮化促進

療のための組織物投与率を算出することができる。

##### IX、眼科的適用

###### A、角膜創傷の治療促進

###### B、内臓移植の治療促進

###### C、その他の眼科的手術の治療促進

##### X、整形外科的適用

###### A、通常の骨折治療促進

###### B、骨折欠如の修復促進

###### C、骨折癒合の容易化

###### D、骨髄性骨髄炎の修復促進

E、組織の成長を促進するために、組織物を補綴物質(間隙充填体など)と組み合わせることができる

###### F、骨及び軟骨の修復促進

###### G、人工臓の取り込み創傷

##### XI、ENT適用

###### A、乳癌切除術後創傷の修復促進

(慢性の非炎症性創傷に対するのと同等の局所的投与を伴うことができる)

###### B、人工組織(軟骨、粘膜、又は人工オステオイタリ管など)との組み合わせ

##### XII、整容的適用

###### A、組織欠損創傷(組織の損傷を伴い組織で充填する)

###### B、褥瘡(例えば、臀部褥瘡)への内部成長を創傷

###### C、皮膚弁における修復促進を創傷

D、組織物の局所的投与によって得られる修復は、創傷を受けにくい組織よりむしろ美容的に満足できるものである、これを創傷形成に局所的に使用できる

###### E、手などの他の組織の修復促進

##### XIII、歯科

###### A、乾燥ソケットの修復促進

###### B、通常のソケット修復促進

C、虚科移植物の内部成長促進

D、血管ラインにおける虚肉成長の促進

E、腎臓腎臓適用

A、スカルファット (Succalfate) のような医薬品を組み合わせて、  
組成物は腎臓及び十二指腸潰瘍の修復を促進

B、炭酸として投与すると、組成物は組織における潰瘍性大腸炎の修復を促進

C、緩和性放出物質中から放出し得る、組成物は内痔性大腸炎の修復を促進

XV、心臓外科

A、人工移植物を組み合わせて、組成物 (特に血管形成誘導因子) は新しい血  
管形成を刺激して、毛管の内皮成長から移植物を再上成化する

XVI、人工内分泌器官

A、血管形成誘導因子は再毛管の内皮成長を刺激して、体内に移動できる人工内  
分泌器官のチューブを形成するために使用できる。チューブを通して毛管が成長を  
刺激され、全く異種移植の内分泌系の使用を可能にするために、細胞又は小島  
(islets) がチューブの外側に成長する。

XVII、皮膚形成

A、現在皮膚、組織塑性性皮膚、尿道及び尿管に使用されているスメントを組み  
合わせて、血管形成促進及び再血管形成率を減少するスメント化チューブ構造の  
治療の刺激に用いることができる。組成物がスメント周囲の組織表面に局所的に  
適用されるように、緩和性放出形態で組成物をスメントに投与する。本発明の組成物の使用は表1 Aに記載したものを全て含むが、これに限定  
されるものではない。

## 表1 A

本発明の組成物の更に可能な適用

I、心臓梗塞の血管再生

A、組成物は、緩和性放出系を用い、梗塞区画内エングで導きながら心臓カ  
テテル化又は直接的に、心筋梗塞の中心部に注入し、梗塞修復を促進する  
B、統一低性コラーゲン抗体で覆ったポリオマーで組成物を保護し、刺激又は  
心筋梗塞部位に移動するようには細胞内投与する

II、神経損傷の血管再生

A、組成物は緩和性放出系で神経再生は管腔に注入されて導通を促進  
B、上記Iと同様に、組成物を導通した導管のリゾームを統一低性神経抗体をこ  
いて、神経損傷部位に移動するように細胞内投与する化学物質がここで記載する血管形成性、有糸分裂性、及び低化性の対応するア  
ッセイ、又は当業界で適用され、或いは将来開発する同様なアッセイにおいて正  
の応答を示すと、本明細書並びに請求の範囲において該化学物質は“定化活性  
”、“有糸分裂活性”又は“血管形成促進活性”を有するとする。

[図面の簡単な説明]

図1は、フロリダでの研究における、血小販放出抽出物の B-T-G (ng/  
ml) と機能性評価との関係を表す図である。図2は、カンザスシティでの研究における、血小販放出抽出物の B-T-G  
(ng/ml) と機能性評価との関係を表す図である。図3は、ミネソタでの研究における、血小販放出抽出物の B-T-G (ng/  
ml) と機能性評価との関係を表す図である。

図4は、血小販放出抽出物の P-R-F 4 と B-T-G との関係を表す図である。

図5は、血小販放出抽出物の P-R-F 4 と B-T-G との関係を表す図である。

図6は、血小販放出抽出物の P-R-F 4 と B-T-G との関係を表す図である。

[発明の詳細な説明]

組織治療の効能は慢性的非炎症性皮膚病について定義されてきた。機能性評  
価グレード1-4は、以下の評価に基づいて創傷創傷成熟度を測定する：Dとよく混合した。統一低性血腫サンプルを次の操作に用いるまで水上に保存  
した。統一低性血腫を2本の滅菌、シリコン加工した50 mlの円筒底心管に移  
し、管にサンプルを平均に分岐させた。次いで管を約4℃で20分間、1.35 x  
gで遠心した。遠心サイクル終了時にローターを停止するまで回転させておいた。  
プレーキはかけなかった。血小販に含む血漿 (platelet-rich p  
lasma; 以後PRPという) である。遠心サンプルの上層血漿を滅菌ベッ  
トでの滅菌、シリコン加工した底心管に移し入れた。1因に4-5 ml 1  
ずつのみを吸い上げることにより、赤血球細胞内移したを PRP のロスを最小と  
することができた。次いで、当業界で公称の方法を用いて、PRPの血小販数をカ  
ウントした。PRPを約4℃で10分間、750 x gで遠心した。血小販のベレットを移動  
させないように注意しながら、上澄み液を捨てた。滅菌ベレットを用いて、0.0  
5 ml HEPES (N-2-ヒドロキエチルピラジニウム-N-エタノール  
緩衝液)、0.03 M チキストロース、0.004 M KCl、0.01 M N  
aCl、を含む、28℃でpHを約5.5に調整した滅菌液 (以後血小販緩衝液  
という) を吸い上げて押し出すことにより、滅菌量1 ml当たり約10<sup>6</sup>個の血  
小販の濃度になるようにベレットを再懸濁した。得られた血小販懸濁液を吸いて滅菌シリコンで高活性化した。好ましくは、血  
小販緩衝液1 ml 当たり約1 ユニットのトロロニンゲを血小販懸濁液に加えて高  
活性化した。血小販とトロロニンゲを室温で約10分間インキュベーションした。インキエ  
ーション後、懸濁液を滅菌ベレットで吸い上げて押し出すことにより、得られ  
た血小販懸濁液を破壊した。若しくは、血小販にその中身を放出させるような他の指針的に活性化すること  
もできる。他の活性化法は、1.0%血小販、好ましくは緩衝液中に2-100 x  
10<sup>6</sup>のADP、好ましくは緩衝液中に25-450 x 10<sup>6</sup>の血小板、及び好  
ましくは緩衝液中に35-50 x 10<sup>6</sup>のアラジド酸を含む緩衝液1 ml 当たり、  
好ましくは0-100 x 10<sup>6</sup>のモノマーコラーゲンである、コラーゲンを含む。(1) 100%以上の酸化：ドレン有り：ドレンッシング (乾燥などによる外  
傷保護) を要する。(2) 100%以上酸化：ドレン有り：ドレンのコントロールのためのドレ  
ッシングを要する。(3) 100%以上酸化：少量のドレンを要する成熟性皮膚：保護的ドレッシング  
のみを要する。(4) 100%以上酸化：100%成熟機能性皮膚：ドレッシングを要しない。  
慢性の非炎症性皮膚病の治療のための好ましい手順は、1日1回、毎日同  
じ時間に、血小販抽出物製品を適用することを含む。製品は、それを洗い落とす前  
に少なくとも8時間剥離上に留まるべきである。製品が剥離上にない限り12  
時間については、食後水で洗うか、或いは適切なドレッシングを剥離部位に  
適用するべきである。創傷治療を目的とする血小販抽出物製品は患者自身の血液から直接調製するこ  
とが好ましいが、その他の世帯の血液又は古い (outdated) 血小販を用  
いても本発明の利益は得られる。患者自身の血液を用いると、貯蔵血液から肺炎、  
AIDS、又はその他の汚染を受ける可能性を避けることができるので、これを  
開示する。患者自身の血液を用いると外來血液に対するほとんどのアレルギーを  
排除することもできる。しかし、製品の代表的原料としては、血液の明視してい  
る血漿 (血漿、肝液、AIDSなどの検査をした人からの血漿)、又は古い血  
小販であり、単一の、又は複数の出所から得ることができ、最も確かな他の  
血漿とトに適用することができる。最後に、その動物物種、同じに調製する他  
の動物、又は他の種の動物由来する血小販を用いて、血小販製品を獣医用途に  
用いることができる。

[実施例]

## 実施例1

ケン酸デキストロース (acid citrate dextrose) 抗  
凝血物質 (以後ACDという) 6 ml中の血漿、又は全血10 ml当たり1  
mlのACDで全血60 mlを得た。シリコンを塗きように回転させて血液をAC

更に他の態様として、P R Pは凍心順にトロンビンで活性化することもできる。活性化P R Pは以下に記載するように、凍心又はペスト調製物に取り込ませることもできる。

好ましい態様においては、得られた上澄みを約4℃で約5分間、950 x gで遠心して、懸濁液中に含まれる放出された血小版ゴーストやファブリンを除去した。この遠心で形成されたペレットを、上澄み血漿液に捨てた。

血小版ゴースト及びファブリンを除去した後、残る上澄みは血小版凝集液中の血小版放出物からなり、これを血小版放出物と呼ぶ。放出物を貯蔵瓶に4 mlで凍結するか、或いはアッセイ用に直ちに使用するか、或いは以下に記載するように凍心又はペスト製品を製造する。

#### 実施例2

血液銀行又はその他の血所から得た血小版から血小版放出物調製することができる。フェレシス (pheresis) 血小版凝集物が血液銀行から得られ、即座に処理される。血小版1ユニットはP R P約200 mlとなるであろう。

P R Pを約4℃で10分間、750 x gで4回遠心し、各遠心後に血小版ペレットを血小版凝集液中に再懸濁する点を繰り返して、灰-無炭化された患者血液サンプルを上記のように処理したと同様の方法で、凍結物を処理して活性化血小版凝集液を得ることができる。4回目遠心後、血小版ペレットを血小版凝集液中に再懸濁して、約10<sup>8</sup>粒/血小版/mlの濃度になる。

血小版凝集液を上記のように活性化して、約4℃で10分間、950 x gで遠心する。上澄みを抽出し、約4℃で15分間、10,000 x gで遠心して残留血小版及び全てのファブリンを除去する。上澄みを抽出した後、ペレットを捨て、血小版放出物である上澄みを貯蔵瓶に4 mlで凍結するか、或いは以下に記載する凍心又はペスト調製物を製造するために直ちに使用する。

血液銀行血小版から製造する更に他の方法として、銀行血小版から製造したP R Pを凍心順に直接活性化することができる。

O. Asnières-Sur-Seine, Franceから市販されている、ベータートロポグロブリンのためのイムノアッセイを、血小版放出物に対応する製品について実施して、抽出物自体に含まれているB-TGの量を測定する。治療終了後に、機能的評価のために刺激をグレード分けした。血小版放出物サンプル (この場合は抽出物) 中に含まれるB-TGの量は、以下の機能的評価によって測定した。血小版放出物製品による治療の成功と関連していた:

度数: B-TG対PFA  
サンプル数: 102  
スピアマン R: 0.2427  
T-値: 2.5023  
2-テイル P: .014

図1は、データの代表的プロットを示す。

#### 実施例3

自己抗原性血小版放出物製品で治療した86例を含む、カンザシティー、U. S. A.での創傷治療研究で、即記の実施例5を繰り返した。血小版放出物サンプル中に含まれるB-TGの量は、以下の機能的評価と関連していた:

度数: B-TG対PFA  
サンプル数: 86  
スピアマン R: 0.3508  
T-値: 3.4328  
2-テイル P: 0.0009

図2は、得られたデータの代表的プロットを示す。

#### 実施例7

自己抗原性血小版放出物製品で治療した32例を含む、ミネソタ、U. S. A.での創傷治療研究で、実施例5を繰り返した。血小版放出物サンプル中に含まれるB-TGの量は、以下の機能的評価と関連していた:

#### 実施例3

血小版放出物製品は好ましくは液体製剤で患者に投与される。血小版放出物抽出物、即ち、血小版凝集液中の凍結血小版放出物は、室温に溶かすことができる。室温で測定した容量の抽出物を凍心管に加えて、血小版凝集液を凍心管に加えて好ましい希釈度となるようにする。血小版凝集液を加える前に、リドカインの5 mlを加えてもよい。この場合、緩衝液は阻害として作用する。また、ある場合には抽出物は更に希釈することなく使用することもできる。

#### 実施例4

その他の態様として、血小版放出物製品は、生物学的に矛盾がなく、かつ上澄み中の活性成分の一時的な「蓄積 (depot)」として作用する阻体物質の抽出物からなる。ペスト製品として適用することもできる。凍結コラーゲン (例えば、Alcon Laboratories, Inc., North W. orth, TXから市販されているAvience®ブランドの製品コラーゲン) のような大分子の物質が適当な阻体である。

ペスト状血小版放出物製品を製造するには、抽出物を溶かして液体製剤と同様に希釈した。凍結の抽出物をAvience®製品コラーゲンのビニルに減圧ビレットで入れ、均一な濃度とする。すなわち、抽出物を凍結コラーゲンと混合してもよい。

得られるペスト状血小版放出物製品を含むビンは、凍心して患者に適用するまでの間、氷と共にプラスチック袋に入れるか、或いは凍結して輸送又は貯蔵する。

#### 実施例5

102例の凍結血液製剤療を含む、フロリダ、U. S. A.での創傷治療研究において、自己抗原性 (autologous) 血小版放出物製品を用いて上記の手順に従って創傷を治療した。血小版放出物製品は、以下のようにして製造した: 実施例1の方法によって製造した血小版放出物製品を更に1:100に希釈して血小版放出物製品を製造した。血小版放出物製品を希釈的に適用する前に、ASSERACHROM B-TGとDiagnostic Stang

度数: B-TG対PFA  
サンプル数: 32  
スピアマン R: 0.3629  
T-値: 2.1329  
2-テイル P: 0.0412

図3は、得られたデータの代表的プロットを示す。

創傷治療の前記実施例に基づいて、創傷治療の成功は製品を製造するために用いられた抽出物に含まれるB-TGの量と関連していた。従って、血小版放出物製品は、好ましくは製品中にあらかじめ定められた範囲の量のB-TGを含むように製造されるべきである。製品は血小版放出物抽出物の希釈物を含むので、抽出物製剤中、又は製品を構成するのにも用いる血小版放出物の量を調製して、抽出物に含まれるB-TG量を予測するべきである。抽出物中のB-TG量はドナーによって、また特定ドナーについては時間によっても変化するため、この製造工程は製品中に所望量のB-TGを含むようにすることができ、

図1から3に示すように、もしも2又はそれ以上の平均PFAグレードを希望する場合には、B-TG量は、製品1 ml当たり少なくとも約25 ngである。もちろん、製品1 ml当たり66 ng以上のB-TG量が、本研究で試験したB-TG量の範囲内で最善の出版を与える。

若しくは、最小又は最少量の血小版放出物を含む血小版放出物製品を製造するために、血小版放出物の他の成分を用いることもできる。これらの成分は、PDG、PDAF、PFAF-4、塩基性FGF、酸性FGF、TGF-2、TGF-β、PDGFG及びフィブロネクチンを含むが、これらに限定されない。実施例8から9は、B-TGとPFAF-4とPDGFGとの関係を示す。

#### 実施例8

41例の自己抗原性血小版放出物製品を用いて、上記B-TGイムノアッセイによってB-TGをアッセイし、またDiagnostic StangからASSERACHROM PFAF-4として市販されているPFAF-4イムノアッセイによってPFAF-4をアッセイした。血小版放出物サンプル中のB-TG量は、

以下に示すようにP-F-4と関連しては：

実験： B-TG対P-F-4  
サンプル数： 41  
スペアマン R： 0.9148  
T-値： 14.1449  
2-テイル P： <0.0001

図4は、データの代表的プロットを示す。

#### 実験例5

41個の自己認識性血小板放出サンプルを上記のB-TGアッセイに従ってアッセイし、また以下のアッセイ手順に従ってPDGFをアッセイした：

#### PDGF\_EIA手順

第1日：

1. ブロック反応プレート (R) (Dynatech Imm-1, 丸底)
  - a) 1ウェル当たりPT-20 (PBS TWEEEN-20, 0.5%) 150  $\mu$ l 添加
  - b) R-プレートのカバーして37°Cで60分間、インキュベーション
  - c) R-プレートを洗い及び乾燥、工程3に送む

2. コート定量化 (Coat Quantitation) プレート (Q) (Dynatech Imm-2, 丸底)

- a) 150  $\mu$ l/ウェルのPDGF cist (コーティング緩衝液中40 ng/ml) 添加
- b) シップロックの袋中、カバーして4°Cで一晩、Q-プレートをインキュベーション

3. ブロック液

- a) ポリプロピレンチューブを洗い、PBAT-T/20 (PBS + 1% BSA + 0.5% T-20) 中でサンプル希釈を実施。よく混合する
4. R-プレートにサンプル添加

図5は、データの代表的プロットを示す。

更に他の試験として、最も又は最濃度の血小板放出物を含む血小板放出物製品を製造するための基礎として、血小板放出物の活性を用いることができる。これらの産性は、繊維芽細胞分裂促進活性 ("FMA")、上皮細胞変化活性 ("ECCA")、ウサギ角膜アッセイ活性 ("RCAA")、及びカラチ/ナイト細胞変化活性 ("KCCA") を含むが、これに限定されない。実施例9は、B-TGとFMAとの関連を示し、実施例10-12は、追加的活性を定義するアッセイを開示する。

#### 実験例9

41個の自己認識性血小板放出サンプルを、上記のB-TGイムノアッセイによってB-TGをアッセイし、また以下のFMA手順によってFMAをアッセイした。

#### 設定

1. 試験すべきFMAサンプルに必要なマイクロタイタープレートの数を決定する (1枚のプレートは、必要なコントロールを "含めて" 24個の4重サンプル、又は32個の3重サンプルを収容する)。
2. 1.0%熱-不溶性ヒアルゲン (1.0% HI-CS) を含むダルグセルの改良イムノ地 (DMEM) を、1プレート当たり約20 ml 用いる。更に40 ml DMEM/1.0% HI-CS を用いる (細胞調整に使用)。
3. 液体状態で凍結貯蔵しておいた、適当な数の3T3 (A31) 繊維芽細胞のチューブを37°C水中で溶かす (チューブ当たりの収率は産粒バッチによって異なる。1マイクロタイタープレート当たり約2,000,000個の生産できる細胞を要する)。
4. 20 ml (5-10 ml) のDMEM/1.0% HI-CSを含む滅菌した50 ml培養チューブ (液体量を少なくして12 ml又は15 mlチューブもこの目的に用いる) に細胞を無菌的に移動する。よく懸濁して、室温中、10分間、450 x g で遠心 (シールドされたスピンバケットローターを備えたMistral 3000 i 中で1400 rpm) する。上澄み液を捨て、細胞ペ

- a) 60  $\mu$ l/ウェルのヤマト-PDGF (PBAT-T-20中に希釈) を2  $\mu$ g/ml で添加
- b) 60  $\mu$ l/ウェルの希釈サンプル又は標準を添加
- c) 袋中、カバーして4°Cで一晩、R-プレートをインキュベーション

第2日：

1. Q-プレート吸引
  - a) Q-プレートを吸引
  - b) 150  $\mu$ l/ウェルのPT-20でQ-プレートをブロック (1-2時間、37°C)
  - c) 吸引、3回洗浄、乾燥

2. R-プレート移動

- a) R-プレートの内容物をQ-プレートに移動 (100  $\mu$ l)
- b) Q-プレートを室温で30分間インキュベーション
- c) 吸引及び洗浄

3. 色反応

- a) 100  $\mu$ l/ウェルのラット抗-キラー-パーオキシダーゼ (1  $\mu$ g/ml)

添加

- a) 室温で1時間インキュベーション
- c) 吸引及び洗浄
- d) 100  $\mu$ l/ウェルの基質 (チタメタルベンジジン) を添加
- e) プレートを読む

血小板放出物サンプル中に含まれるB-TGの量は、以下のようPDGFの量と関連していた：

B-TG対PDGF

実験： B-TG対PDGF  
サンプル数： 41  
スペアマン R： 0.8103  
T-値： 8.6359  
2-テイル P： <0.001

レットを滅菌した12 ml培養チューブに移して、10 ml DMEM/1.0% HI-CS中に再懸濁する。混濁を繰り返す。

5. 細胞レットを約2-5 ml DMEM/1.0% HI-CS中に再懸濁する。細胞カウントを行う。

6. DMEM/1.0% HI-CS中に細胞を希釈して、1 ml当たり約200,000細胞の濃度を得る (各プレートにつき10-11 mlが必要)。

7. 8又は12のマルチチャンネルピペッターと滅菌オートリザーバーを用いて、96ウェルのマイクロタイタープレートに1ウェル当たり100  $\mu$ lを添加する。

細胞一懸濁を適切に維持するために、1列当たり少なくとも1回ピペッターの懸濁液を吸引、押し出して廃棄する必要がある。

8. 各ウェルに100  $\mu$ l DMEM/1.0% HI-CSを添加する (合計1  $\mu$ l当たり200  $\mu$ lの液体量となる)。

9. 細胞系及びプレート調整の日付にラベルする。プレートを37°C、5% CO<sub>2</sub>で3日間、又は繊維芽細胞が集密的になるまでインキュベーションする。

#### 実験例9/第3日

マイクロタイタープレートを開始してから3日目に、地盤を0.8% HI-CS/DMEMに交換して継続して培養する必要がある。

1. 顕微鏡下でプレートを検査して、繊維芽細胞が集密的に成長したかどうかを決定する (細胞間にギャップがあってはならない)。もしも細胞が集密的であったら、観察する。もしも細胞が集密的でなかったら、更に1日成長させるか、或いは廃棄する。

2. 16 ml/プレート 0.8% HI-CS/DMEMを調整する。
3. フード下、滅菌バリア (barrier) シートを広げて置く。1度に1個ずつプレートをシリンクに取り出し、注意深く、やさしく動かしてプレートの液体を全て1度に出す。直ちに再びカバーをする。

4. 滅菌フードに蓋をやり、滅菌バリア上で開いたプレートをやさしく吸引、吸引して過剰の液体を除去する。

特表平5-500516 (8)

5、8又は12のチャンネルビッターを用いて、1ウェル当たり150ulの0.8% H1-C5/DMEMを早く、かつやさしく添加する。出来る限り細胞を揺さないように注意しなければならない。工程3から5を次のプレートに繰り返す。

6、プレートは37℃、5% CO<sub>2</sub>で6時間インキュベーションする。

7、過剰の0.8% H1-C5を吸引皿に取って置く。

#### 細胞移植/増殖交換後5時間

10%から0.8%のH1-C5に増殖交換をした5時間後に、細胞は観察される状態になっている。

1、試験すべき各コントロール及びサンプルのための各マイクロタイププレートの標識及び配置を決める。

2、上記左の部から始めて、最初の3又は4ウェルには50ulの0.8% H1-C5/DMEMのみを入れる (これはプレートのバックグラウンドコントロールとして働く)。

3、次の3又は4ウェルには (水平方向に読む)、1ウェル当たり20ulの非増殖H1-C5及び30ulの0.8% H1-C5を入れる (従って最終希釈度は10% H1-C5)。

4、次の3又は4ウェルには、50ulの血小版凝集コントロール (10ml血小版凝集液+50ulトロンピン) を入れる。

5、50ulの試験/コントロールサンプルを添加する。

6、プレートは37℃、5% CO<sub>2</sub>で18時間インキュベーションする (時間の一貫性が重要である)。

#### 放射線照射

試験及びコントロールサンプルで照射した18時間後に、FMAマイクロタイププレートに放射性トシジで標識し、分裂促進活性を試験する。

1、放射性使用量中の事故防止を吸収するために、作業場表面一面を使い捨てのペーパーライナーで覆う。保護手袋を装着して使用する。

2、以下のように10uCiの[3H]-チミン/1ml DMEM溶液を調製

する: 0.5ccの[3H]-チミン (NEN cat no. NET-02 7.67 Ci/mmol, 1mCi/ml) を49.5ml DMEMに適切な倍率に希す (1/100希釈)。

3、各ウェルに50ulの[3H]-チミン/DMEM溶液を添加。添加のために残りの放射性溶液を冷蔵庫に保管する。

4、ビレット先端、平底、少量の凍結媒体で育する分配容器、及びペーパーライナーを放射線筒ごみ箱に正しく棄棄する。

5、プレートに放射線とラベルして、それを吸収するためのトレー中で37℃、5% CO<sub>2</sub>で6時間インキュベーションする。

#### 回収

1、UNCイムノウォッシュを用いて、放射性増殖を迅速深く吸引する。吸引先端が細胞と接触することを防ぐために、適切な「持ち上げピン (raise pin)」を必ず使用する。

2、多チャンネルビッターで200ul PBSを加えて細胞を洗浄する。NUNCイムノウォッシュで吸引する。

3、各ウェルに200ulの0.25%トリプシン/HBSS (Ca, Mgを含まない) を添加する。37℃、5% CO<sub>2</sub>で30分間インキュベーションする。

4、Skatron Combi Cell Harvesterを用いてプレートをガラススライドペーパー上に回収する。

5、Skatron Filter Transfer 器具を用いて、湿ったフィルターペーパーディスクをレンチレーションバイアル (Packard Pic o Pro Vials) に直接に移す。

6、フィルターディスクを一度、或いは必要オープン中で1-2時間乾燥させる。

#### シンチレーション増強

1、各バイアルに4mlのシンチレーションカクテル (Beckman Ready-Safe) を添加する。

2、バイアルに蓋を強く密着して数回激しく振って、フィルターをカクテルに完全にさらし、また気泡があるときは抜く。

#### カウント

1、バイアルをBeckman LS1701の緑のラックに左から右の順に置く。

2、18番目の位置にONバイアルを有する空の緑のラックからなる「プログラムラック」をまずカウンタに置き、機械にプログラムN0.1を使用するよう指示する。

3、プログラムN0.1は以下のようにプログラムされる:

一線り送り: 3

一カウント時間: 2分

一H# : No

一サンプルリビート: 1

一データ計算: CPM

一SCRB: Yes

一RCM: Yes

一バイアルサイズ: ミニ

一カウントプランク: No

4、まず右側で「後方から始め (back to front)」, 次いで左側で「始めから終わりへ」動かしながら、残りのラックをカウンタに置く。常に作のストップラックで終わる。

5、同時に「RESET」ボタンを押す。

6、RESETが終了し、プリンターに十分紙があることをチェックしたら、STARTボタンを押してR1を再びかける。

7、最初のプリントアウトを見て、プログラムが正しく使われているかを確認する。

1/ED-50のユニットは、線増倍373段階において分裂促進活性の50%刺激をもたらす血小版はサンプルの希釈度を表す。例えば、もしもサンプルの0.25又は1:4希釈が50%刺激を与えるならば、1/ED-50は4ユニットである。同様に、1:8の刺激度は1/ED-50 8ユニットを与える。

血小版は放射線増強剤中のB-T-G量は、以下のようにFMA活性に関連していた:

変数: B-T-G対FMA

サンプル数: 41

スピアマン R: 0.7674

T-値: 6.1927

2-テール P: <0.0001

図6は、データの代表プロットを記録する。

#### 実施例1

ECC活性は以下の手順で決定される。

#### 細胞調製

1、3-4歳のPrimaria (Farcon #3824) 75cm<sup>2</sup>フラスコで、ウサギ動脈内腔 (Rabbit Wound Capillary Endothelial: RWCE) を60-85% 無菌的に成長させる。

2、分化性の約20-24時間前に、増殖を除去してHBSS (Ca/Mgを含まない、6ml/フラスコ) でフラスコを2回 (2x) 洗う。

3、最後にHBSS洗剤を除去して、各フラスコに12-15ml (一貫して) の増地199中の0.2%ラクトアミンを添加する (これは最少栄養を促進し、血清誘導化刺激を減少するので、細胞は調剤物質に必要する準備ができてい

る)。フラスコの増殖交換の時間を記録する。

4、翌日、以下のものを準備する:

a) M199 (LA-M199) 中の50-100ml 0.2%ラクトアミン

b) 9ml HBSS中に1ml EC2 (1X) を希釈することによる、20-30ml (5ml/75cm<sup>2</sup>フラスコ) のミニエムカクテルNo. 2 (EC2-1X)

5、0.2% LA-M199を除去してフラスコを6-10ml HBSSで洗う。直ちに5ml EC2 (1X) を加えて、室温で正確に14分間インキュ



バージョンする。

6. 酵素の不活性化を助長するために、少なくとも2ml/フラスコの0.2% LA-M199を含む50mmのポリプロピレンチューブにフラスコからのEC2をアールする。直ちに各フラスコに5mlの0.2% LA-M199を加える。

7. 滅菌細胞スクレーパー (American Scientific Products Cat. #T4206-1) で底から細胞をそとくき出す。

8. EC2ブールに細胞/均相を加える。最終リンス用として、1個のフラスコに10mlの0.2% LA-M199を加える。リンス液をフラスコからフラスコへ移して、細胞と共にアールする。

9. もしも最終容量が40mlを越す場合には、液心のために細胞を2つのチューブに分ける。細胞を室温、1400rpm (Mistral 3000离心器で約450g) で10分間遠心する。

10. 液早くほ出すことにより上澄みを捨てる。ペレットを合計8mlの0.2% LA-M199に再懸濁 (もしも分けた場合にはアールする) し、15mlの遠心管に移す。更に2mlの塩地で管を洗浄し、再懸濁した細胞に加える。室温、1400rpmで10分間遠心する。

11. 細胞をカウントするために、2-5mlの0.2% LA-M199 (両遠心を合わせるために、ペレットサイズ及び計測した細胞収率に容量を調整する) 中に再懸濁する。

12. 細胞のカウント:

- 細胞懸液40μlをトリプルセル30ulに加える。
- 血球計数器の両側のものを。
- 10倍の倍率で、8個の1mm<sup>2</sup>中の細胞をカウントする。生存細胞(ブルー)の数を記録する。真実のサイズや形の細胞をカウントしないこと。
- 生存細胞数を2.5x10<sup>4</sup>をかけた数値が1ml当たりの細胞数である。
- 細胞濃度を0.75x10<sup>4</sup>細胞/ml LA-M199 (即ち、33.750細胞/45ulのウェル) に調整する。約2.25ml/チャンパーが必要

を切り取る。フィルターを取り扱いは、決して手ではなく、ピンセットで行い、かつ顔のみを待つこと。

4. 滅菌ペトリ皿の中央にFN/HBSS 3-4mlを入れる。光っている側を下にして、FN/HBSSの上にフィルターを置き、FN/HBSSをフィルターの下に広げられるようにし: フィルター上にFN/HBSSを全くのせないようにする。

5. ペトリ皿の蓋をして室温で30分間置く。

6. FN/HBSSを注意深く注ぎ出し (フィルターをくっつかせたま、中身を片側に傾け、完全に広げ出す)。フィルターを持ち上げて、新しいFN/HBSS 3-4mlを中央に入れて、フィルターの他の側について《注ぎっている側を下にする》同様に移す。

7. これでコーティングは完了し、フィルターは使用可能になる。

- \*注: a) 一貫性を得るために、底部チャンパーの光輝時間が、フィルターの第2の側のコーティング完了と一致するように、フィルターを直ちに使用する。
- b) 2枚のフィルターを準備するときは、同時に両方を光輝するために急がなくてもよいように、第2のチャンパーを光輝する前に第1のチャンパーを光輝できるように、コーティング時間を15分間隔とすることを勧める。

#### チャンパーの準備

- 底室 (dH<sub>2</sub>O) を底室からNeuro Probeの48ウェル走化性チャンパーを取り出す。きれいなdH<sub>2</sub>Oでよく洗浄する。頂部部品とガスケット (gasket) をティッシュで乾燥して、底室部品をきれいな窒素ガスで吹き付け乾燥する。
- チャンパー底面にのせる試験サンプルを準備する。各ウェルは約250μl、0-25.5μlを有している。
- 下のチャンパーにあるウェルにサンプル (約2.6-1-26.5μl) を加える。

要である。

a) 例: 1ml当たり1.5x10<sup>4</sup>細胞が3mlあるとする。この場合、最終的には以下の容量に調整すべきである:

$$\frac{(3ml) \times (1.5 \times 10^4 \text{ 細胞/ml})}{(0.75 \times 10^4 \text{ 細胞/ml})} = 5.95 \text{ ml}$$

従って、最終濃度0.75x10<sup>4</sup>を得るためには、0.2% LA-M199を2.95ml加える。簡単にすると、33.750細胞/45ul 0.2% LA-M199/ウェルの濃度での細胞/チャンパー間で45ウェルを準備する。

\*調整される容量

フラスコサイズ (cm <sup>3</sup> )	0.2% LA-199 必要容量(ml)	HBSS 容量(ml)	EC2 (1X)
25	5	5	3
75	15	6-10	5
150	30	10-15	10

#### フィルターの準備

- 凍結ストックから20mlの10ugフィボネクテン (Sigma #F4759) /1ml HBSS (FN/HBSS) を調製する。この調製のためにのみポリプロピレン製チップとチューブを用いる。(例: 凍結ストック=1mg/ml dH<sub>2</sub>O-HBSS。従って、HBSS 19.8mlにストック200ulを希釈する。) 使用時まで氷上に保存。
- 1チャンパー当たり1個のNucleoporeポリプロピレンフィルター (8.0um pores, PVPP, Neuro Probe Inc., 301-229-8598) を使用する。
- フィルター\*の方向性を見えるために、フィルターの光っている側を上向き

\*注: a) 両側の“ポジティブな液面面の凹凸 (meniscus)”を得るために、液体で“やや”上唇を除去”することが必要である。これは、液のチャンパーを充填する間に起きる乾涸を中和する働きをする。泡の生成を避けること。

b) 最高の一貫性を得るためには、ポジティブな液面凹凸を使用する。両チャンパー間における4個のウェルの最初の最後のカム (A, L) は酸化には用いないので、これはHBSSで充填する。従って、上のチャンパーの間と同じくHBSSで充填し、細胞を充填しない。

4. フィルターの準備ができたら、上記した方法でFN/HBSSを送り出す。ペトリ皿から注意深くフィルターを持ち上げる: いずれの側も皿の縁に触れてはならない。フィルターをゆっくりと持ち上げることにより、フィルター上の液のFN/HBSSは少なくなる。この時点でフィルターを不注意に落としたり、これに触れてはならない。

5. ピンセットでフィルターの間隔を持ち上げて、フィルターを中央をチャンパー中央におろし、次いで底部ウェルを置く。フィルターは光っている側を上にするように!

\*注: 常にチャンパー/フィルターの一貫性を保持すること: 即ち、常にチャンパーの底層を保持して、フィルターの上底の部分を取り除くこと。

6. 必要な場合にのみ、フィルターを正しい位置に置くために少し再調整する。

7. フィルターのすて上りガasketを置くが、触れないようにする。

8. チャンパーの上半分をガasketの頂部に置き、両側を一緒に下に押す。スクリュウに矢を付けながら、ゆっくりと下に押す。

9. チャンパーをチェックし、ウェルを見渡してフィルターの下に泡ができていないかを再度確認する: 泡は酸化性を妨害するので、あればこれを記録する。

10. 両端 (A, L) の4個のウェルにHBSS (5ul) を加える。

11. 次いで細胞懸液45ul (即ち、1ml当たり0.75x10<sup>4</sup>の細胞) を、残りのウェルに加える。

\*注：底部の空気を排除しないようにピペットの先端を一定の角度にして細胞を加える。もしも泡がでたら、注意深く液体を出して、再度充填する。充填後は、すべてのウェルが均一に見えるようにする。そうでない場合は、底面空気を吸い、やり直すこと。

12. チャンバーをガラス又はポリプロピレンのトレイにのせて、水に浸したガーゼ布を置いて（これは湿度を増し、蒸発を防ぐ）、アルミニウムオイルでゆるやかにカバーする。

13. 37℃、5M CO<sub>2</sub>で4時間インキュベーションする。

#### フィルターの除去及びゴミ取り

1. スライドガラスの一方の端に目印とチャンバー番号を刻む。アルコールでよく消毒し、乾燥させる。
2. 底部プレートを下にして持ち上げるゴミを吸く。
3. 前標が上向きになるように、ペーパータオル上にチャンバーを置く。
4. 水平線に沿って金チャンバーをペーパータオル上に運ぶ。
5. 底部プレートの四隅を押して、これが下へ落ちて底部プレートと平行になるようにする。フィルターはガasketに付いていなければならない。
6. 底部プレートを除去して直ちにテルガム (Terga) 溶液 (テルガム1/4 + ティーストブランチ/dH<sub>2</sub>O 1000 ml) 中に浸す。
7. “移動した細胞” がここで見えてくる。ここからはフィルターの面を洗ってはいけません。
8. ピンセットでフィルターの一番右端をつまみ、左端はそのまゝの状態で、フィルターを少し右に引く。端だけが縁にかかるようにする。
9. プラスチッククリップでその端をつかみ、フィルターをガasketから持ち上げる。他の端に異物も11個のクリップをつける。チャンバーの製品部品を直ちにテルガム中に入れる。
10. 細胞液の上に（常に）非移動部をPBSで洗う。非移動部”移動細胞”をPBSで洗うてはならない。
11. フィルターをびんと強力、ワイパーブレードに対して非移動部を引く（一

方向のみに、一方の端から他方へ）。

12. この工程を4-5回繰り返す。蒸発とゴミ取りの間の時間を最小にして、非移動細胞が乾燥/固着して不完全な除去になることを防ぐ。ゴミ取りの前にワイパーブレードを常に乾燥させる。

13. 適当な鋭いスライ드에、鋭い端と同じ様に切り取った塊がくるが、ただし反対側になるように、フィルターを置く。一度乾かす。

14. テルガムに入れて置いたチャンバー部品をdH<sub>2</sub>Oで洗浄し、チャンバーをきれいにするまで新しいdH<sub>2</sub>O中に保存する。

#### フィルターの染色

染色後、直ちにフィルターを洗うようにデジタメーター (LKB) の用意をしておく。

1. 切り取った膜を持つ乾燥フィルター/スライドの端に、小さい黒のクリップを置く。
2. 3つの溶液の各々に、順次5回、各所に5秒ずつ浸すことにより、Leukostain染色 (Fisher) を行う。溶液ごとに過剰の染料をペーパータオル又はガーゼでよく取る。
3. 5回目の後、第3の染料に更に30秒間フィルターを浸ける。
4. dH<sub>2</sub>O中でフィルターを洗浄する (dH<sub>2</sub>Oを2回取り替える)。過剰のdH<sub>2</sub>Oをよく取る。
5. 他のきれいなガラススライド (マークなし) をフィルター上に直接のせて、注意深く、しかししっかりと均等に押し付けて空気の泡を追い出す。
6. デジタメーターを洗う。

#### 染色フィルターのデジタメーター読み取り

1. 10-20分間デジタメーター (LKB) を暖めおく。
2. 染色した、温ったスライドを読み取りテーブルに置き、以下の正しいセッティングにする：

#### チャンバーの設置

以下の手順は、産化性チャンバー及びガasketから製造したバグなどを除くのに用いる (出典: Terri Superdock, 118-61, 2/11/89)。

1. 汚れたガasket及びチャンバーを脱イオン水でよく洗浄する。対応するガasketとチャンバーを1リットルのプラスチックビーカー中に入れる (2セット/ビーカー)。
2. 0.75%テルガム溶液 (7.5 g/mlテルガム/1リットルdH<sub>2</sub>O: 500-750 ml / 2チャンバー) を50℃に加熱する。50℃を越えてはならない。
3. チャンバーとガasketを50℃テルガムで置く。
4. ビーカーを50℃水浴中に入れる。水浴をカバーして2時間インキュベーションする。

\*ガasketの掃除については工程10及び11を参照されたい。

5. チャンバーのみを取り出し、dH<sub>2</sub>Oでよく洗浄する。チャンバーを1リットルのプラスチックビーカー (1000 ml) 中に入れる。2-3チャンバー/ビーカー)。
6. チャンバーを室温、1M NaOH (600-700 ml / ビーカー) で置く。ビーカーをフェイルでカバーする。
7. ビーカーを50℃のカバーした水浴中で30分間インキュベーションする。
8. チャンバーをdH<sub>2</sub>Oで非常によく洗浄する。チャンバー及び大きな異質層を高いプラスチックタブに入れる。異質層の固着を防ぐようにチャンバー (頂部及び底部) の向きを変える。タブを洗いのそばのマグネティックスカラーに擦せる。
9. タブにdH<sub>2</sub>Oを滴らし、2時間洗う。洗いは、水が正しく循環しているかを確認し、オーバーフローしないようにタブ中にきれいな脱イオン水を流しに換える。
10. ガasketを0.75%テルガムを入れたビーカー中に入れて、30分間消毒乾燥させる。

カラム	Xポジション	*トランプ
B	113.6	1
C	119.6	2
D	127.0	3
E	132.6	4
F	138.6	5
G	146.6	6
H	152.6	7
I	158.0	8
J	166.0	9
K	171.6	10

その他のデジタメーターセッティング

- a) スムーシング: 3
- b) x-幅: 4
- c) y-スキャン: 19
- d) y-ストップ: 43

3. スライドを置く。カラムポジションを確認する。
4. スライドを動かさずに下にスライドを留める。
5. 各列での“Y”セッティングを確認する。
6. ルーラーを“home”に置く。“Esc”
7. 蓋を閉じる。
8. デジタメーターを“Enter” (コンピュータ上で) にし、次いで“8” (又は“Run”) にする。
9. LKBの“GSXL”プログラムを用いて、デジタメーターからのピーク面積を計算する。

11. dH<sub>2</sub>Oでよく洗浄し、ガスケットを1リットルのdH<sub>2</sub>O中に入れる。30分間水を変えて、2時間静置後処理する。
12. チャンバーとガスケットを組み立てて（スクリューで留める）、新しいdH<sub>2</sub>Oを満した平らなポリプロピレンのバスに入れる。アルミニウムオイルでカバーし、1週間11回水を取り替える。
13. 使用前にチャンパー及びガスケットを新しいdH<sub>2</sub>Oでよく洗浄する。

#### 実施例12

KCCA活性は以下の手順によって確認される。

#### 細胞の調製

1. 正常ヒト表皮角化細胞 (Normal Human Epidermal Keratinocyte: NHEK) の T-25 フラスコ中の増殖細胞、KGM (Keratinocyte Growth Medium Supplemental and Serum Free) の500mlビン、KBM (Keratinocyte Basal Medium) の500mlビン、及び、HEPES Buffered Saline Solution Trypsin [(0.0025% W/V) / EDTA (0.01% W/V)] 溶液、トリプシン中和液からなる細胞培養系を含むEpiPackをClonetics Corporation, San Diego, Californiaから得る。
2. 到着後、これを開き、37℃、5% CO<sub>2</sub>で、封をしたT-25 フラスコを平衡化温度にインキュベーションする。
3. 減菌容器にKGM5mlを吸める。
4. 減菌フィールド (パイオワード) でT-25 フラスコを70%インソロビアルコールで徹底的に拭く。
5. 増殖を促進する；少量の漂白剤を含む容器に捨てて、暖めたKGM5mlで交換する。キャップをわしめて蓋をさが、あまり固くしない。
6. 37℃のインキュベーションに際し、細胞培養用5% CO<sub>2</sub>で24-48時間静置する。細胞培養物を無菌的にしてはならない。

2. 25℃、220xgで10分間遠心する。上澄みを捨てる。
3. 細胞ペレットをKGM5mlに再懸濁して、遠心管中に入れる。
4. 遠心し、上澄みを捨てて、KGM2mlに再懸濁して血球数計でカウントする。
5. 消化液アッセイを実施し、新しい密度をセットする。
2. 新しい細胞密度をセットするための細胞数計増殖にのみKGMを使用する。
3. 新しいKGM M, W, Fを細胞に考える。

T-25 フラスコ用=15ml KGM

T-25 フラスコ用=5ml KGM

#### 消化のための細胞調製

1. T-25 フラスコからの細胞数計培養のところで記載した手順に従って細胞をトリプシン化し、遠心する。
  2. 細胞をKBMに再懸濁して、血球数計でカウントする。合計細胞数 = (平均カウント) x (ml KBM) x (トリプシン液-希釈) x (1x10<sup>4</sup>)
  3. 最終的細胞濃度は5.56x10<sup>4</sup>細胞/ml (又は25.000細胞/4.5ul) にする。
- 必要時で細胞を氷上に保存する。

#### フィルターの種類

1. 5ug/ml フィブリンゲン 20ml (Sigma #F4759) を凍結ストックから調製する。調製にはポリプロピレンチューブ及びチューブを用いる。(例: 凍結ストック=0.1mg/ml dH<sub>2</sub>O-HBSS。凍結ストック1.000ulをHBSS19.0mlに希釈する) 使用時まで氷上に保存する。
2. 1チャンパー当たり1箇のNucleoporeポリプロピレンフィルター (8.0um pores, PVDF, Neuro Probe Inc., 303-229-8588) を使用する。

#### T-25 フラスコからの細胞数計培養

1. パイオワード下、増殖を除去 (少量の漂白剤を含む容器に捨てる) して、HEPES緩衝液2mlで細胞を洗浄する。
2. HEPESを捨てて、トリプシン/EDTA溶液2mlを加え、2分間おく。
3. トリプシン/EDTAを除去し、トリプシン中和液2mlを含む減菌遠心管中に入れる。フラスコのキャップをして遠心管で破棄する。
4. 細胞が分離してよく見えるを確認する。更に3分後、フラスコの手の方の0から1回と、他の方の手の方で1回たたき固くした。遠心管下で細胞が容易に破棄されるを確認する。トリプシン化のため、4分以下にはならないこと。
5. パイオワード下で、直ちにトリプシン中和液2mlを加えて洗浄する。細胞を減菌遠心管 (#3 30ml) に移して、新たにトリプシン中和液2mlでフラスコを洗浄して、遠心管に入れる。
6. 遠心管下でフラスコをチェックする；キャップを閉じて細胞が残っていないか確認する。
7. もし大量の細胞が残っていたら、工程1から工程5を繰り返して、遠心管に加える。もし全く残っていないか、減り少量だけなら、遠心工程に進む。
8. 25℃、220xgで10分間遠心して、上澄みを捨てる。
9. 細胞ペレットを暖めたKGM5mlに再懸濁して、血球数計でカウントする。
10. 所望の密度で新しいフラスコに接種する。

#### T-75 フラスコからの細胞数計培養 (7-75-80%濃度)

1. 以下の量を用いる以外はT-25 フラスコと同様の手順に言う；
  - a. HEPES緩衝液5ml
  - b. トリプシン/EDTA溶液7ml
  - c. トリプシン中和液7mlで細胞をフラスコから洗いだし、ブルーマックスチューブに移す。
  - d. フラスコをトリプシン中和液3mlで再び洗浄し、ブルーマックスチューブに入れる。

3. フィルターへの方向性を考えるために、フィルターの光っている面の上端を切り取る。フィルターの取り強い、決して手でなく、ピンセットで行い、かつ端のみを持つこと。
4. 減菌ペトリ皿の中央にFN/HBSS 3-4mlを入れる。光っている側を下にして、FN/HBSSの面をフィルターを置き、FN/HBSSをフィルターの下に広げられるようにし、フィルター上にFN/HBSSを全くのせないようにする。
5. ペトリ皿の蓋を逆さまで室温で30分間置く。
6. FN/HBSSを逆さまで逆さま出し (フィルターをくっ付けたまま、中身を片側に傾け、完全に抜き出す)、フィルターを持ち上げて、新しいFN/HBSS 3-4mlを中央に入れて、フィルターの他の側について (置いている側を下にする) 同様繰り返す。

7. これでコーティングは完了し、フィルターは使用可能になる。
 

\*注: a) 一貫性を得るために、底部チャンパーの光線が、フィルターの第2の側のコーティング完了と一致するように、フィルターを底面に使用する。

b) 2枚のフィルターを準備するときは、同時に両方を完了するために急がなくてもよいように、第2のチャンパーを完了する前に第1のチャンパーを充填できるように、コーティング時間を15分間ずらすことを始める。

#### チャンパーの種類

1. 蒸留水 (dH<sub>2</sub>O) 保存箱からNeuro Probeの48ウェル消化性チャンパーを取り出す。きれいなdH<sub>2</sub>Oでよく洗浄する。底部部品とガスケットをチューブで乾燥して、底部部品をきれいな窒素ガスで吹き付け乾燥する。
2. チャンパー底部にのせる試験サンプルを準備する。各ウェルは約0.6-0.26.5ulを有している。
3. 下のチャンパーにあるウェルにサンプル (約2.6.1-26.5ul) を加える。

\*注：a) 所望の「ボリティブな媒体面の凹凸」を得るために、媒体でやや「上部を除法」することが必要である。これは、残りのチャンパーを充填する間に起きる乾燥を中和する働きをする。泡の生成を避けること。  
b) 最良の一貫性を得るためには、ボリティブな置換ビレットを使用する。両チャンパー間における個々のウェルの最前と最後のカム(A、L)は、流注性には用いないので、これらをH B S Sで覆う。従って、上のチャンパーの間にもH B S Sで充填し、組織を充填しない。

4. フィルターの準備ができた。上記した方法でF N/H B S Sを抜き出す。ベトリ皿から注意深くフィルターを持ち上げる。いずれの側も面の端に触れてはならない。フィルターをゆっくりと持ち上げることにより、フィルター上の残りのF N/H B S Sは少ない。この時点でフィルターを不注注に落としたり、これに触れてはならない。

5. ビンセットでフィルターの間隙を持ち上げて、フィルターの中央をチャンパー中央におろし、次いで底部ウェルを覆う。フィルターは光っている側を上にするように！

\*注：常にチャンパー/フィルターの一貫性を保持すること：即ち、常にチャンパーの間隙を保持して、フィルターの上左側の部分を切り取ること。  
6. 必要な場合にのみ、フィルターを正しい位置に置くために少し調節する。

7. フィルターのすべりにガasketを置くが、触れないようにする。

8. チャンパーの上半分をフィルターの頂部に置き、両者を一緒に下に押す。スクリュに力を加えながら、きゅちりと下に行き。

9. チャンパーをチェックし、ウェルを戻してフィルターの下に泡ができていないかを再度確認する；泡は流注性を妨害するので、あればこれを記録する。

10. 間隙(A、L)の4個のウェルにH B S S 4 u lを加える。

11. 次いで細胞培養液4 u l (即ち、1 ml当たり0.75 x 10<sup>6</sup>個の細胞)を、残りのウェルに加える。

\*注：底層の空気を捕捉しないようにビレットの先端を一定の角度にして回転を加える。もしも泡ができてきたら、注意深く媒体を出して、再度充填する。充填後は、すべてのウェルが均一に見えるようにする。そうでない場合には、底層空気を吸い、やり直すこと。

12. チャンパーをガラス又はポリプロピレンのトレイにのせて、水に浸したガーゼ片を置いて「これは湿度を増し、蒸発を防ぐ」、アルミニウムホイルで覆うやけにカバーする。

13. 37度、5% CO<sub>2</sub>で4時間インキュベーションする。

#### フィルターの除去および取り付け

1. スライドガラスの一方の端に目印とチャンパー番号を刻む。アルコールよく消毒にし、乾燥する。

2. 頂部プレートを下に持って底層のゴミを無く。

3. 両端が上左端になるように、ペーパータオル上にチャンパーを置く。

4. 永年軸に沿って全チャンパーをペーパータオル上に並べさせる。

5. 頂部プレートの四隅を押して、これが下へ落ちて底部プレートと平行になるようにする。フィルターはガasketに付いていなければならない。

6. 底部プレートを除去して直ちにテルガジム溶液(テルガジム1/4ティースプーンd H<sub>2</sub>O 1000 ml)中に浸す。

7. 「移動した細胞」がここで現れてくる。ここからはフィルターの面を見ればならない。

8. ビンセットでフィルターの一番右端をつまみ、左端はそのままの状態で、フィルターを少し右に引っ張り、端だけが縁にかかるようにする。

9. プラスチッククリップでこの端をつかみ、フィルターをガasketから持ち上げる。他の端に索索くもう1個のクリップをつける。チャンパーの頂部部品を直ちにテルガジム中に入れる。

10. 細胞膜を上にして(常に)非移動側をP B S中で覆う。移動細胞をP B S中で覆うてはならない。

11. フィルターをびんと張り、ワイパーブレードに対して非移動側を引く(→

方向のみに、一方の端から他方へ)。

12. この工程を4〜5回繰り返す。産生とつき取りの間の時間を最小にして、非移動細胞が乾燥/固着して不完全な除去になることを防ぐ。各つき取りの前にワイパーブレードを常に乾燥する。

13. 濃縮を数回スライド上に、同じ方と同じ側に切り取った隅がくるが、ただし反対側になるように、フィルターを置く。一度乾燥させる。

14. テルガジムに入れて置いたチャンパー部品をd H<sub>2</sub>Oで洗淨し、チャンパーをきれいにすると新しいd H<sub>2</sub>O中に保存する。

#### フィルターの染色

染色後、直ちにフィルターを洗めるようにデントメーター(LKB)の用意をしておく。

1. 切り取った隅を持つ乾燥フィルター/スライドの端に、小さい翼のクリップを置く。

2. 3つの溶液の各々に、順次5回、各回5秒ずつ浸すことにより、Leukostain染色(Fishersブランド)する。溶液ごとに過剰の染料をペーパータオル又はガーゼでよく取る。

3. 5回目の後、家3の溶液に更に30秒間フィルターを浸ける。

4. d H<sub>2</sub>O中でフィルターを洗淨する(d H<sub>2</sub>Oを2回取り替える)。過剰のd H<sub>2</sub>Oをよく取る。

5. 他きれいなガラススライド(マークなし)をフィルター上に直接のせて、注意深く、しかししっかりと一緒に押し付けて空気の泡を追い出す。

6. デントメーターを脱む。

#### 染色フィルターのデントメーター読み取り

1. 10〜20分間デントメーター(LKB)を暖めておく。

2. 染色した、温ったスライドを読み取りテーブルに置き、以下の正しいセッティングにする：

カム	Xポジジョン	"トラック"
B	113.6	1
C	119.6	2
D	127.0	3
E	132.6	4
F	138.6	5
G	146.6	6
H	152.6	7
I	158.0	8
J	166.0	9
K	171.6	10

その他のデントメーターセッティング

- a) スムーシング: 3
- b) x-幅: 4
- c) y-スタート: 19
- d) y-ストップ: 43

3. スライドを置く。カムポジジョンを確認する。

4. スライドを動かさずに下にスライドを留める。

5. 各列での"Y"セッティングを確認する。

6. ルーラーを"home"に送る。"Escr"

7. 蓋を閉じる。

8. デントメーターを"Enter"(コンピュータ上で)にし、次いで

6"(又は"Run")にする。

9. LKBの"GSXL"プログラムを用いて、デントメーターからのデータ面積を計算する。

# チャンバーの構造

以下の手順は、酸化性チャンバー及びガスケットから残留タンク質などを除去するのに用いる（出典：Terri Supercond. 118:61, 7/21/83）。

1、汚れたガスケット及びチャンバーを軟い温水でよく洗浄する。対応するガスケットとチャンバーを1リットルのプラスチックビーカー中に入れる（2セットビーカー）。

2、0.75%テルガジウム溶液（7.5g/mLテルガジウム/1リットルdH<sub>2</sub>O；500-750mL/2チャンバー）を50℃に加熱する。50℃を越えはならない。

3、チャンバーとガスケットを50℃テルガジウムで置く。

4、ビーカーを50℃水中中に入れる。水をカバーして2時間インキュベーションする。

\*ガスケットの除染については図10及び11を参照されたい。

5、チャンバーのみを取り出し、dH<sub>2</sub>Oでよく洗浄する。チャンバーを1リットルのプラスチックビーカー（1000mL）中に入れる；2-3チャンバー/ビーカー）。

6、チャンバーを濃度、1M NaOH（600-700mL/ビーカー）で置く。ビーカーをフィルムでカバーする。

7、ビーカーを50℃のオーバーバシ水中中で30分間インキュベーションする。

8、チャンバーをdH<sub>2</sub>Oで非常によく洗浄する。チャンバー及び大きな操作室を新しいプラスチックビーカーに入れる。洗浄時の図を切らないようにチャンバー（底部及び底面）の向きを覚える。タブを洗ったその後のマグネティックスターラーに懸架する。

9、タブにdH<sub>2</sub>Oを満たし、2時間放置しなす。水が正しく循環していかにを確認し、オーバーフローしないようにタブ中に入れたタイフーンを流しに流す。

10、ガスケットを0.75%テルガジウムを入れたビーカー中に入れて、30分間緩慢波打らせる。

ら、正しく洗浄されたことになり、これには通常10-15分を要する。

ウサギを滅菌ドレープに置く。Allergan Pharmaceuticals, Inc., Irvine, CA 92713からOphthalmicとして市販されている0.5%塩化プロパリン3-S溶液を、部分静脈として各目に適用する。試験中に目が乾燥したときにはいつでも、必要に応じて洗浄液を滴する。

小さい組織用ピンセットを用いて眼窩を引き出す。ピンセットをゆっくりと目の内側に動かして、視神経を締め付けないように注意しながら、少量の組織をつまみ、作業中に目がこの位置に止まっていることを確認する。

Beaver Surgical Products, Waltham, MA 02154から市販されているBeaver eye blade No. 5210のスケパル（scalpel）を両手に持ったままに引き、約3.0mm長さの切片を切り取る。眼窩水をしきり出させる角膜穿孔を引き起こすことがある。もしもこれが起きた場合には、動物を殺してしまわなければならない。

U. Mueller, Chicago, IL 60648から市販されている製品NO P-2040のElschnig毛様体刺激スケパル（1mm幅、1.0mm長さ）を用いて、角膜を通過して毛様体筋の方向にそって溝を作り、毛様体筋から約2mmのところまで止める。眼科の突進を左右に動かしてポリマーベレットのための“ポケット”を作るが、ベレットは毛様体筋から1mmよりも近くなれないように、探針を進め過ぎないよう注意する。ピンセットでポリマーベレットをプラスチックから持ち上げて、他の切片の場所に置く。スケパルを用いて、ベレットを首に掛けてポケットまで押し込む。この領域を消毒し、ベレット挿入を容易にするために麻醉液を滴する。ベレットはポケット内に濃縮されなければならない。角膜の外側にある管に掛けてスケパルを引くことにより、ポケットから眼窩空気を押し出す。

次いでピンセットを緩める。まぶたをそっと引き上げて手で開くと、目は正常の位置に戻る。感染の可能性を減らすために、Burrhoughs Wellcome Co., Research Triangle Park, NC 27

11、dH<sub>2</sub>Oでよく洗浄し、ガスケットを1リットルのdH<sub>2</sub>O中に入れる。30分間に水を替えて、2時間緩慢波打らせる。

12、チャンバーとガスケットを組み立てて（スクリーで締めくく）、新しいdH<sub>2</sub>Oを満たした平らなポリプロピレンのバスに入れる。アルミニウムペイルでカバーし、1週間に1回水を取り替える。

13、使用前にチャンバー及びガスケットを新しいdH<sub>2</sub>Oでよく洗浄する。

## 実施例 13

RC A A活性は以下の手順で定義される。

癌形成促進活性を試験するための各サンプル局として、2-4歳のポリマーベレットを準備する。Hydromed Researchとして市販可能、タイプBNC、組織培養グレード（Hydromed Sciences, New Brunswick, NJ 08901から市販されている）の10% v/vポリマー溶液、70% v/vエタノール中の1% v/vポリエチレングリコールを準備する（これ以降ポリマー溶液と略す）。ポリマー溶液を試験サンプルと1:1 v/vで混合する。プラスチックのオートクレーブバッグの一片を、ビンと保たれていることを確認しながら、平らな表面にテープで貼る。次いでこの表面をアルコールでよく乾拭きする。1:1混合物200μlをプラスチック上に滴下する。次いでポリマーベレットを縦向きで2時間、又は乾燥するまで、乾燥させる。

角膜炎用アッセイを4-6オンドのNew Zealandシロウザで実施する。Veterinary Products, Bristol Laboratories, Syracuse, NY 13201からKetasetとして市販されている、塩化タリウム100mg/mLとAvesco Co., Inc., Port Dodge, IA 50501からPromacとして市販されているアゾプロマリン（0.1mg/mL）とを同じシリンジ中で1:1 v/vで混合することによって、眼液を調製する。各ウサギにつき4-5ccを用いる。23ゲージの針を用いて、眼窩前を腎臓又は脾臓に注射して、注射液の部分をやさしくもむ。ウサギが数日後にすくなく上向きに寝た場合

709からNeosporin眼科溶液として市販されている抗菌液3滴を各目に投与する。

試験すべき各サンプルにつきウサギ1匹を用いる（即ち、ウサギ1匹につき両目ジンプルを2ベレット、各目につき1個用いる）。

3、5及び7日目に、ベレット方向に毛細管が直接成長しているかについて、目を観察して、Glabrone et al., J. Natl. Cancer Inst. 52:413-427(1974)及びDando et al., U.S. Patent No. 4,003,938（いずれもその内容を参照することにより、ここに包含される）の方法に従ってグレード分けする。毛細管の成長を記録するために7日目に目の写真を取る。従って、本発明はその精神又は本質的特質を逸脱することなく、他の特徴を種々実装することが可能である。これまでの記載から、本発明の精神又は範囲を逸脱することなく、上述した方法や手段の各種変更が可能であることが当業者には自明であろう。

図 3

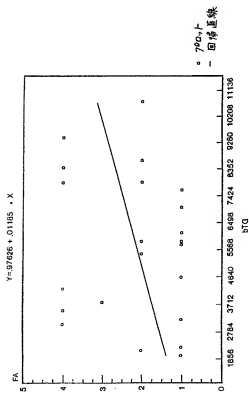


図 1

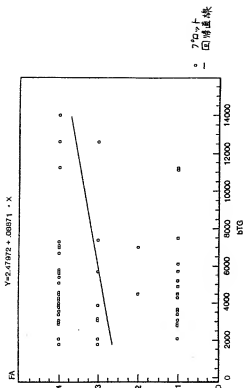


図 4

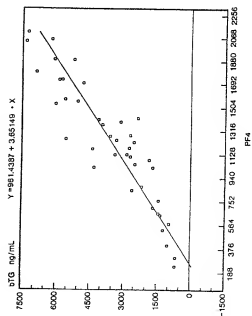


図 2

